

No title available.

Patent Number: DD273073

Publication date: 1989-11-01

Inventor(s): BOEHM WOLF-DIETER (DD); JAROSS WERNER (DD); BECKERT RAINER (DD);
ALBRECHT STEFFEN (DD)

Applicant(s):: MEDIZINISCHE AKADEMIE CARL GUS (DD)

Requested
Patent: ☐ DD273073Application
Number: DD19880316973 19880621Priority Number
(s): DD19880316973 19880621

IPC Classification: C12Q1/00 ; G01N21/76

EC Classification:

Equivalents:

Abstract

Data supplied from the esp@cenet database - I2

**BEST AVAILABLE COPY**



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 273 073 A1

4(51) C 12 Q 1/00
G 01 N 21/76

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

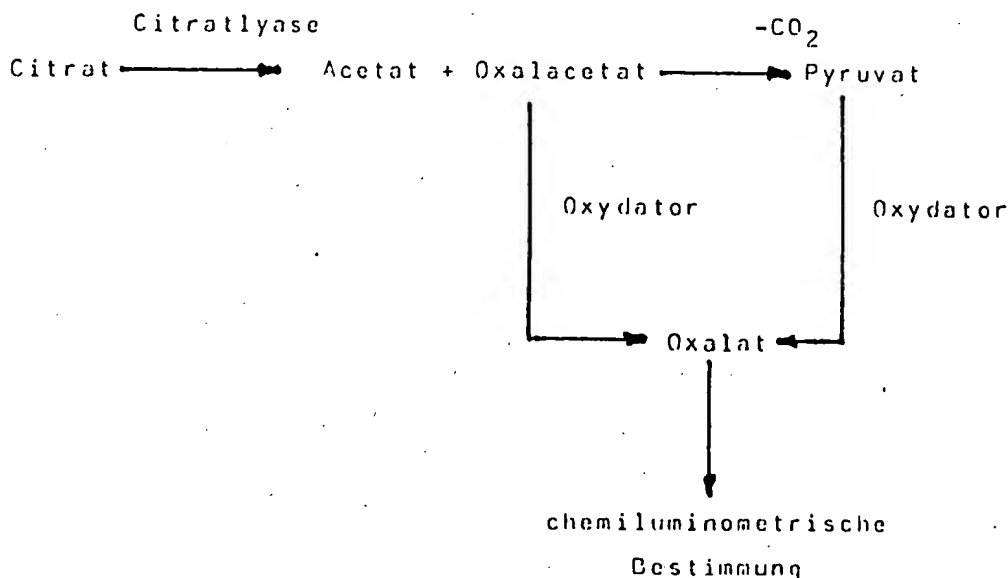
(21)	WP C 12 Q / 316 973 1	(22)	21.08.88	(44)	01.11.89
(71)	Medizinische Akademie „Carl Gustav Carus“, Direktorat für Forschung, Fetscherstraße 74, Dresden, 8019, DD				
(72)	Albrecht, Steffen, Dr. rer. nat.; Böhm, Wolf-Dieter, Dr. med.; Beckert, Rainer, Dr. sc. nat.; Jaroß, Werner, Prof. Dr. sc. med., DD				
(54)	Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Citrat				

(55) Citronensäure, Citratbestimmung, Chemilumineszenz, Photonenemission, Oxydator, chemische Analytik, enzymatische Spaltung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Citrat der allgemeinen Formel $R^1R^2R^3[OOC-CH_2-C(OH)(COO)-CH_2-COO]$.

Citratbestimmungen werden insbesondere benötigt bei der Untersuchung von chemischen Reaktionsgemischen, Lebensmitteln, biologischen Medien mit Zellstoffwechsel und Körperflüssigkeiten, d. h. in der klinisch-chemischen Analytik. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß das in der Probe enthaltene Citrat spezifisch enzymatisch gespalten, in Oxalat überführt und anschließend die Photonenemission bei dessen oxydativer Zersetzung mit einem Chemilumineszenzmeßgerät registriert wird. Dabei können auch sehr kleine Mengen Citrat quantitativ erfaßt werden.

Decarboxylierungsprodukt Brenztraubensäure werden dann mit einem geeigneten Oxydationsmittel, vorzugsweise einem löslichen Salz einer Halogensauerstoffsäure mit oder ohne Katalysator in Oxalat überführt. Dieses wird oxydativ zersetzt und die dabei auftretende Photonenemission registriert.



Die Menge der emittierten Photonen steht in direktem Zusammenhang mit der Citratkonzentration. Schwerlösliche Citrate bzw. organische Citronensäurederivate müssen entsprechend aufgeschlossen werden. Je nach Empfindlichkeit des Photomultipliers im verwendeten Luminometer lassen sich dabei Citratkonzentrationen im μmol - bis nmol -Bereich erfassen. Die chemiluminometrische Messung erfolgt im Temperaturbereich von 20 bis 50°C , vorzugsweise bei Zimmertemperatur.

Besondere Vorzüge des Verfahrens sind:

1. hohe Sensitivität durch das angewendete Lumineszenzmeßprinzip
2. hohe Spezifität bedingt durch den enzymatischen Teilschritt mittels Citratlyase
3. große Anwendungsbreite
4. größere Wirtschaftlichkeit im Vergleich zum einzig ähnlich sensitiven vollenzymatischen Verfahren (vgl. Pkt. 3. bei Charakteristik des bekannten Standes der Technik) durch Einsparung der Enzyme Malatdehydrogenase, Lactatdehydrogenase bzw. des Coenzyms NADH
5. energieintensive Verfahrensschritte (Erhitzen, Einengen, Destillieren) entfallen

Ausführungsbeispiel

Alle Messungen erfolgten an einem LKB-Luminometer 1250.

Beispiel 1

Bestimmung des Gehaltes einer wäßrigen Citronensäurelösung im Bereich von 1–100 mg/l.

Probenvorbereitung:

Es werden 500 μl Probelösung und 500 μl Glycylglycinpuffer ($\text{pH} = 7,8$) gemischt und mit 20 μl Citratlyase (5 mg Protein/ml; Boehringer-Mannheim-GmbH, Best.-Nr. 354074) 10 min inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 500 μl Oxydator (10 g Natriumchlorat und 100 mg Osmiumtetroxid auf 100 ml bidest. Wasser), welchen man eine Stunde bei Raumtemperatur einwirken läßt und dann 100 μl 10 n HCl zusetzt.

Von der so vorbereiteten Probelösung werden 100 μl in die Meßkammer des Luminometers dosiert, welche 1 ml der folgenden Reagenzlösung enthält: 10 g Bis(Cyclohexyl)carbodiimid, 500 mg 9,10-Diphenylanthracen und 2 ml 30%iges H_2O_2 in 20 ml absolutem Ethanol. Gleichzeitig wird die Messung der Photonenemission gestartet. Aus dem über die ersten zwei Sekunden integrierten Meßwert erhält man durch eine unter analogen Bedingungen aufgestellte Eichkurve (10, 20, 40, 60, 80, 100 mg/l Citronensäure) den Citratgehalt der Probe.

Beispiel 2

Bestimmung des Citratgehaltes eines Fruchtsaftes

Die Probenvorbereitung erfolgt analog Bsp. 1. Die Reagenzlösung für die luminometrische Bestimmung wird wie folgt zusammengestellt:

5 g N-Cyclohexyl-N'-3-trimethylammonium-propyl-carbodiimid-p-toluensulfonat $[\text{Me}_3\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4]^\oplus [\text{H}_3\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3]^\ominus$, 500 mg Brillantsulfoflavin und 5 ml 30%iges H_2O_2 werden in 50 ml bidest. Wasser gelöst. Es werden 100 μl Probelösung zu einem Milliliter Reagenzlösung in die Meßkammer des Luminometers dosiert, bei simultaner Messung der Photonenemission über die ersten 2 Sekunden. Zur Ermittlung der citratunspezifischen Emission (Eigengehalt der Probe an Oxalat) werden 100 μl analog vorbereitete Probelösung ohne Citratlyasezusatz eingesetzt. Die Differenz der beiden Meßwerte ergibt den Eigengehalt der Probe an Citrat, welcher einer entsprechend aufgestellten Eichkurve aus wäßriger Citratlösung entnommen werden kann.